

## PCT

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL



(article 36 et règle 70 du PCT)

REC'D 30 MAR 2004

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire International (formulaire PCT/PEA/416)	
Demande internationale No. PCT/FR 03/02483	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07.08.2003	Date de priorité (jour/mois/année) 07.08.2002
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K16/26		
Déposant BIO-RAD PASTEUR et al.		

BEST AVAILABLE COPY

1.	Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2.	Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.  <input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).  Ces annexes comprennent feuilles.
3.	Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :  I <input checked="" type="checkbox"/> Base de l'opinion II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 30.01.2004	Date d'achèvement du présent rapport 30.03.2004
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international  Office européen des brevets - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tél. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Fonctionnaire autorisé Le Flao, K N° de téléphone +31 70 340-1040 

PCT/FR 03/02483

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n°

PCT/FR 03/02483

☐ des dessins,                      feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport.)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté

Oui: Revendications 1-35

Non: Revendications

Activité inventive

Oui: Revendications 1-35

Non: Revendications

Possibilité d'application industrielle

Oui: Revendications 1-35

Non: Revendications

2. Citations et explications

**voir feuille séparée**

**Concernant le point V**

**Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: WO 00 45176 A (GALLUSSER ANDREAS ;KARL JOHANN (DE); LILL HELMUT (DE); STAHL PETER) 3 août 2000 (2000-08-03)

D2: US 6 117 644 A (DEBOLD ADOLFO J) 12 septembre 2000 (2000-09-12)

D3: GOETZE JENS PETER ET AL: "Quantification of pro-B-type natriuretic peptide and its products in human plasma by use of an analysis independent of precursor processing." CLINICAL CHEMISTRY. UNITED STATES JUL 2002, vol. 48, no. 7, juillet 2002 (2002-07), pages 1035-1042, XP001149219 ISSN: 0009-9147

D4: WO 00 35951 A (NG LEONG LOKE ;UNIV LEICESTER (GB)) 22 juin 2000 (2000-06-22)

D1 décrit le dosage de proBNP via l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes de la partie N terminale de la protéine (ie. reconnaissant les acides aminés 1 à 21 et 30 à 38 cf. page 15, ligne 20 et page 16, ligne 10). La préparation d'anticorps via l'immunisation avec le fragment NT-pro-BNP (1-76) est également décrite (page 17, exemple 3). La réactivité de différents anticorps monoclonaux et polyclonaux vis à vis de différents épitopes du NT-pro-BNP est testée et notamment vis à vis de l'épitope formé des acides aminés 64 à 76 (tableaux 1 à 3). Aucun des anticorps testés ne réagit avec ce domaine. Les anticorps décrits permettent de détecter l'insuffisance cardiaque avec une sensibilité de 93.3% pour les patients dont la maladie est classée aux stades I à IV (selon NYHA) et de 81.1% pour les patients dont la maladie est classée au stade I (selon NYHA) (page 24, exemple 6).

D2 décrit des anticorps liant le BNP et leur utilisation afin de diagnostiquer le rejet de transplantation cardiaque. Il est fait référence à des anticorps dirigés notamment contre les fragments formés des acides aminés 1 à 25 et 52 à 76 (RAPR) (colonne 2, lignes 5 à

12, colonne 4, lignes 13 à 26). Des anticorps monoclonaux dirigés contre le fragment BNP52-76 sont préparés (colonne 9, lignes 31 à 56) .

D3 décrit le dosage de proBNP dans le plasma via la détection de l'épitope formé par les acides aminés 1 à 10 de la protéine (production d'un anticorps décrit à la page 1036, 4ème paragraphe). L'intérêt de la détection du proBNP comme marqueur de dysfonctionnement cardiaque est discuté (page 1041, 2nd paragraphe).

D4 décrit un anticorps dirigé contre la partie 1-76 de proBNP (NT-proBNP) et plus particulièrement contre le peptide 65-76 (RKMVLYTLRAPR) ainsi que son utilisation pour détecter l'insuffisance cardiaque (page 2, lignes 6 à 23 et page 4, lignes 8 à 20).

## **NOUVEAUTE**

Aucun document ne décrit d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant un épitope contenant la séquence RAPR76S77P. Les procédés d'obtention d'anticorps selon la revendication 4 (immunisation avec la molécule entière de proBNP puis épuisement avec les peptides BNP (77-108) et BNP (1-76)) ou selon la revendication 5 (immunisation avec un peptide contenant la séquence RAPRSP) ne sont divulgués dans aucun des documents cités. Les peptides des revendications 16 à 22 contiennent tous le motif RAPRSP, avec éventuellement d'autres résidus aux deux extrémités et ce motif n'est pas divulgué dans les documents cités. Aussi l'objet des revendications 1 à 35 est nouveau (Article 33(2) PCT).

## **ACTIVITE INVENTIVE**

### **1. Les anticorps (revendications 1-3 et 29)**

Le document D1, qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche, décrit (voir ci dessus) un anticorps reconnaissant le proBNP (1-108) dont diffère celui qui fait l'objet de la revendication 1 en ce qu'il est dirigé contre l'épitope RAPRSP du proBNP. Les deux anticorps sont utilisés pour détecter l'insuffisance cardiaque. L'effet de la différence est que l'anticorps de la présente application se lie au proBNP (1-108) mais pas aux formes BNP (1-76) ou BNP (77-108).

Le problème que se propose de résoudre la présente invention peut donc être considéré comme étant de fournir d'autres anticorps reconnaissant le proBNP (1-108) et permettant de distinguer le proBNP (1-108) des protéines BNP (1-76) ou BNP (77-108). Les anticorps des revendications 1-3 et 29 semblent résoudre le problème. Il est considéré que l'objet des revendications 1-3 et 29 présente une activité inventive pour la raison suivante. Il s'agit d'anticorps ayant une propriété nouvelle qui n'est pas anticipée dans les documents cités. Cette propriété de reconnaître le proBNP (1-108) sans se lier au BNP (1-76) ni au BNP (77-108) peut être considérée comme un effet inattendu.

Cette propriété est liée au peptide RAPRSP (et à d'autres peptides contenant ce motif). Bien que différents peptides aient été utilisés pour préparer des anticorps monoclonaux et polyclonaux (voir D4 et notamment le peptide RKMVLYTLRAPR, contenant le motif RAPR ie. 4 acides aminés des 6 du motif de la revendication 1), l'idée d'utiliser le domaine charnière où le proBNP est clivé comme épitope n'est pas anticipée dans les documents cités. Aussi l'objet des revendications 1-3 et 29 est considéré inventif (Article 33(3) PCT).

2. Procédé de préparation d'anticorps (revendications 4-8,23,24) et anticorps définis par leur procédé de préparation (revendications 9,10,25-28) ; Utilisation des anticorps afin de détecter l'insuffisance cardiaque (revendications 11-15, 30-35) ; Peptides (revendications 16-22).

L'objet de ces revendications 4-28 et 30-35 est considéré comme inventif (article 33(3) PCT) pour les raisons suivantes: les procédés de préparation permettent d'obtenir des anticorps ayant une propriété particulière (voir le raisonnement pour les anticorps) qui est nouvelle et inventive. L'utilisation de ces anticorps est inventive du fait de la nouveauté et du caractère inventif des anticorps. Les peptides sont considérés inventifs car dans aucun des documents cités il n'est envisagé d'utiliser la zone charnière de clivage pour générer des anticorps. Il n'est pas non plus suggéré que des anticorps puissent réagir avec ce domaine.

## **CLARTE**

Les termes suivants: "substantiellement" utilisé dans les revendications 1-3, "de façon

spécifique" utilisé dans les revendications 1-3, 23, 24, 26 et "à l'exclusion substantielle" utilisés dans les revendications 23 et 24 sont vagues et équivoques, et laissent un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles ils se réfèrent. L'objet desdites revendications n'est donc pas clairement défini (article 6 PCT).

Translation

03 FEB 2003

PATENT COOPERATION TREATY

10/523400

PCT/FR/03/002483



# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>BET03P0750</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/FR2003/002483</b>	International filing date (day/month/year) <b>07 août 2003 (07.08.2003)</b>	Priority date (day/month/year) <b>07 août 2002 (07.08.2002)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>C07K 16/26, C12N 5/12, G01N 33/53, C07K 7/06, 7/08, 16/06, G01N 33/74, C12N 5/20</b>		
Applicant <b>BIO-RAD PASTEUR</b>		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>30 janvier 2004 (30.01.2004)</b>	Date of completion of this report <b>30 March 2004 (30.03.2004)</b>
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR2003/002483

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
 pages \_\_\_\_\_ 1-56 \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_ 1-35 \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_ 1/16-16/16 \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 03/02483

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-35	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-35	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-35	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 00 45176 A (GALLUSSER ANDREAS; KARL JOHANN (DE); LILL HELMUT (DE); STAHL PETER) 3 August 2000 (2000-08-03);
- D2: US 6 117 644 A (DEBOLD ADOLFO J) 12 September 2000 (2000-09-12);
- D3: GOETZE JENS PETER ET AL: "Quantification of pro-B-type natriuretic peptide and its products in human plasma by use of an analysis independent of precursor processing." CLINICAL CHEMISTRY, UNITED STATES JUL 2002, vol 48, no. 7, July 2002 (2002-07), pages 1035-1042, XP001149219 ISSN: 0009-9147;
- D4: WO 00 35951 A (NG LEONG LOKE; UNIV LEICESTER (GB)) 22 June 2000 (2000-06-22).

D1 describes proBNP assays using monoclonal antibodies to epitopes of the N terminal portion of the protein (i.e. that recognise amino acids 1 to 21 and 30 to 38; cf. page 15, line 20 and page 16, line 10). The preparation of

antibodies by means of immunisation with the NT-pro-BNP fragment (1-76) is also described (page 17, example 3). In said document, the reactivity of various monoclonal and polyclonal antibodies with respect to the various NT-pro-BNP epitopes and, in particular, the epitope consisting of amino acids 64-76 (tables 1 to 3) was tested. None of the tested antibodies reacts with this domain. The described antibodies enable heart failure to be detected with 93.3% sensitivity in patients with stage I to IV disease (NYHA classification) and 81.1% sensitivity in patients with stage I disease (NYHA classification) (page 24, example 6).

D2 describes antibodies that bind to BNP and the use of same to diagnose the rejection of a heart transplant. Reference is made to antibodies directed, in particular, against those fragments consisting of amino acids 1 to 25 and 52 to 76 (RAPR) (column 2, lines 5 to 12; and column 4, lines 13 to 26). The preparation of monoclonal antibodies to the BNP52-76 fragment is described (column 9, lines 31 to 56).

D3 describes proBNP assays performed in plasma by detecting the epitope consisting of amino acids 1 to 10 of the protein (the production of an antibody is described on page 1036, fourth paragraph). The benefit of detecting proBNP as a marker of cardiac dysfunction is discussed in this document (page 1041, second paragraph).

D4 describes an antibody to the 1-76 portion of proBNP (NT-proBNP) and, more specifically, to the 65-76 peptide (RKMVLYTLRAPR), as well as the use of same to detect heart failure (page 2, lines 6 to 23 and page 4, lines 8 to 20).

**NOVELTY**

None of the documents describes an anti proBNP (1-108) antibody that recognises an epitope containing the RAPR76S77P sequence. The antibody production methods as per claim 4 (an immunisation step using the entire proBNP molecule followed by a depletion step using the BNP (77-108) and BNP (1-76) peptides) or as per claim 5 (an immunisation step using a peptide containing the RAPRSP sequence) are not disclosed in any of the cited documents. The peptides in claims 16 to 22 all contain the RAPRSP unit and optionally have other residues at both ends. This unit is not disclosed in the cited documents. It follows that the subject matter of claims 1 to 35 is novel (PCT Article 33(2)).

**INVENTIVE STEP:**

1. Antibodies (claims 1-3 and 29)

Document D1, which is considered to be the closest prior art, describes (see below) an antibody that recognises proBNP (1-108), from which the one disclosed in claim 1 differs in that it is directed against the RAPRSP epitope of proBNP. Both antibodies are used to detect heart failure. The effect of the above difference is that the antibody of the present application binds to proBNP (1-108) but not to the BNP (1-76) or BNP (77-108) forms.

The problem that the present invention is intended to solve can therefore be considered to be that of providing alternative antibodies that recognise proBNP (1-108) and can differentiate between proBNP

(1-108) and the BNP (1-76) or BNP (77-108) proteins. The antibodies in claims 1-3 and 29 appear to solve this problem. The subject matter of claims 1-3 and 29 is considered to involve an inventive step, for the following reason: said subject matter relates to antibodies, which have a novel property that is not anticipated by the documents cited. This property of recognising proBNP (1-108) without binding to BNP (1-76) or BNP (77-108) can be considered tantamount to an unexpected effect.

This property is relates to the RAPRSP peptide (and to other peptides containing this unit). Even though various peptides have been used to prepare monoclonal or polyclonal antibodies (see D4, in particular, the RKMVLYTLRAPR peptide containing the RAPR unit, i.e. 4 of the 6 amino acids of the unit in claim 1), the idea of using the hinge domain in which the proBNP is cleaved as an epitope is not anticipated by the documents cited. As a result, the subject matter of claims 1-3 and 29 is considered to be inventive (PCT Article 33(3)).

2. The antibody preparation method (claims 4-8, 23 and 24) and the antibodies defined by means of the preparation method therefor (claims 9, 10 and 25-28); the use of antibodies to detect heart failure (claims 11-15 and 30-35); and peptides (claims 16-22).

The subject matter of claims 4-28 and 30-35 is considered to be inventive (PCT Article 33(3)), for the following reasons: the preparation methods enable the production of antibodies that have a specific property that is novel and inventive (see

the arguments concerning said antibodies). The use of these antibodies is inventive because said antibodies are novel and inventive. The peptides are considered to be inventive because the use of the cleavage hinge area to generate antibodies is not envisaged in any of the cited documents. Similarly, it is not suggested that antibodies can react with that domain.

**CLARITY**

The following terms are vague and ambiguous and cast doubt on the meaning of the technical features to which they refer:

- "substantially" in claims 1-3;
- "in a specific manner" in claims 1-3, 23, 24 and 26;  
and
- "with the substantial exception of" in claims 23 and 24.

As a result, the subject matter of said claims has not been defined clearly (PCT Article 6).